



RealCycler®

Progenie molecular
Artes y Oficios 37. Valencia 46021. España. Tel. 902 91 05 05 Fax 902 91 05 06
www.progenie-molecular.com

ECSALI-G v.1

1 Uso previsto

RealCycler ECSALI-G es un kit de reactivos que permite la detección cualitativa por PCR a tiempo real del ADN de *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae* y *Listeria monocytogenes* en muestras clínicas. El sistema incluye un control interno de amplificación para prevenir los falsos negativos debidos a la inhibición de la reacción.

2 Especificaciones

- **Sensibilidad:** 1 copia/µL *E.coli,* 1 copia/µL *Streptococcus agalactiae* y 10 copias/µL *Listeria monocytogenes*.
- **Especificidad:** *E.coli* (gen N-acetilgalactosamina-6-fosfato deacetilasa*)*, *Streptococcus agalactiae* (gen Sip*)* y *Listeria monocytogenes* (gen hlyA).

3 Estabilidad y almacenamiento

Todos los componentes del kit *RealCycler* ECSALI-G deben ser almacenados a -20ºC.
El kit es estable a - 20ºC hasta la fecha de caducidad (ver etiqueta externa del kit).

4 Descripción del método

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) está basada en la amplificación de una región específica del genoma del patógeno usando primers y sondas específicos. En la PCR a tiempo real se utilizan sondas marcadas con fluorocromos. Hay una emisión de fluorescencia que es proporcional a la cantidad de ADN presente en la muestra. El *Cycle threshold* (Ct) es el ciclo de la PCR en el que se detecta inicialmente un aumento en la señal de fluorescencia. La amplificación de *E.coli* se detecta en FAM, la de *Streptococcus agalactiae* en TxR , la de *Listeria monocytogenes* en Alx647 y la del control interno en Alx532.

5 Composición

RealCycler ECSALI-G incluye la mezcla de reacción **Amplimix**, un **Control Positivo ADN *E.coli***, un **Control Positivo ADN *S. agalactiae*** y un **Control Positivo ADN *Listeria***. Todos los reactivos están listos para su uso sin añadir ni reconstituir ningún componente.

Componente	Viales	Núm.	Volumen	Conserv.
AmpliMix		1	970 µL	-15 /-25 ºC
Control Positivo ADN *E. coli*		1	60 µL	-15 /-25ºC
Control Positivo ADN *S. agalactiae*		1	60 µL	-15 /-25ºC
Control Positivo ADN *Listeria*		1	60 µL	-15 /-25ºC

6 Material y equipamiento adicional requerido y no suministrado

- Equipo de PCR a tiempo real
- Kit de extracción de ADN
- Guantes desechables
- Pipetas calibradas
- Puntas de pipeta con filtro
- Congelador (-20ºC)

7 Advertencias y precauciones

- Todos los componentes del kit deben mantenerse en frío mientras se están manipulando.
- Después de añadir el ADN, minimizar el tiempo necesario para iniciar el programa de amplificación.
- Los tubos con la mezcla de amplificación no deben exponerse a la luz durante un periodo de tiempo prolongado.
- Descongelar y congelar repetidas veces los reactivos puede disminuir la sensibilidad del kit.
- Usar guantes desechables.
- Usar pipetas calibradas y puntas de pipeta con filtro.
- Los ensayos deben llevarse a cabo por personal cualificado y siguiendo las buenas prácticas de laboratorio.
- No usar el kit después de la fecha de caducidad.
- Uso para diagnóstico *in vitro*.

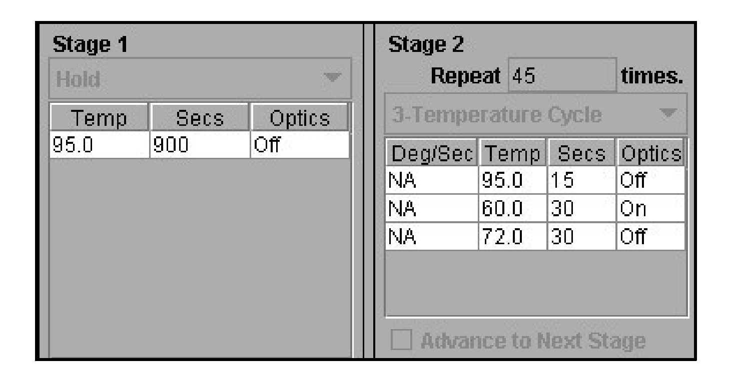
8 Muestras clínicas

- Recoger las muestras en tubos estériles.
- Almacenarlas y transportarlas congeladas a -20ºC hasta su uso.
- Utilizar ADN bien purificado y libre de inhibidores de la PCR.

9 Procedimiento

a) Extracción de ADN

b) Protocolo



Selección de fluoróforos:
- FAM: detecta *Escherichia coli*
- TxR: detecta *Streptococcus agalactiae*
- Alx647: detecta *Listeria monocytogenes.*
- Alx532: detecta el control interno.

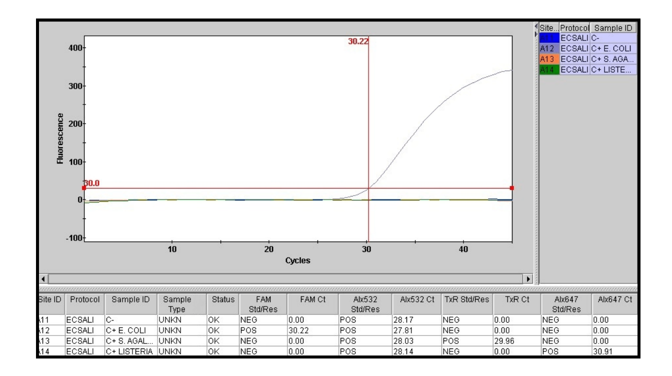
c) Preparación de la reacción

- Descongelar la **AmpliMix** y los **Controles Positivos *E. coli*, *S. agalactiae*** y ***Listeria***.
- Tomar una alícuota de **20 µL** de Amplimix y añadir **5 µL** del ADN de cada muestra o control a cada tubo.
- Colocar los tubos en el equipo.
- Seleccionar el protocolo "ECSALI-G".
- Iniciar el programa de amplificación.

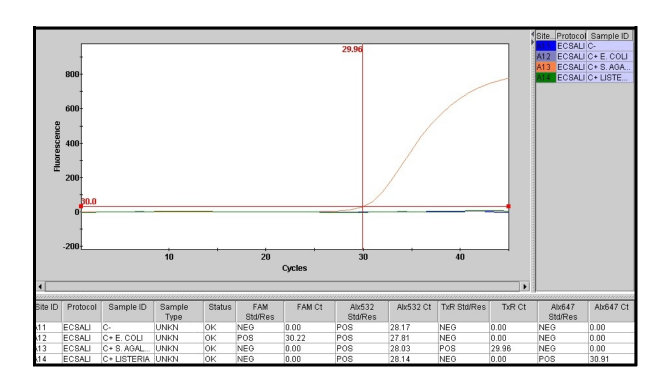
d) Interpretación de los resultados

FAM Std/Res	TxR Std/Res	Alx647 Std/Res	Alx532 Std/Res	Interpretación
POS	ND	ND	Indiferente	POSITIVO *E. coli*
ND	POS	ND	Indiferente	POSITIVO *S. agalactiae*
ND	ND	POS	Indiferente	POSITIVO *Listeria*
POS	POS	ND	Indiferente	POSITIVO *E. coli* y *S. agalactiae*
POS	ND	POS	Indiferente	POSITIVO *E. coli* y *Listeria*
ND	POS	POS	Indiferente	POSITIVO *S. agalactiae* y *Listeria*
POS	POS	POS	Indiferente	POSITIVO *E. coli, S. agalactiae* y *Listeria*
ND	ND	ND	POS	NO SE DETECTA
ND	ND	ND	ND	NO VALORABLE

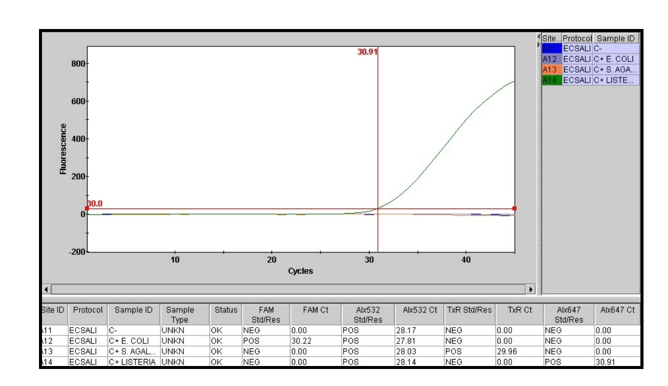
e) Ejemplo de resultado



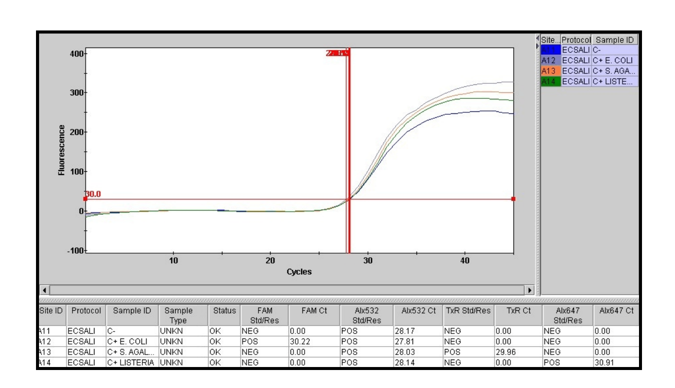
Gráfica 1 (Canal FAM: *E. coli*): Resultado obtenido al amplificar un control negativo, un control positivo *E. coli,* un control positivo *S. agalactiae* y un control positivo *Listeria*. Control negativo (A11 en azul): ausencia de señal. Control positivo *E. coli* (A12 en gris): se observa una señal con Ct=30,22. Control positivo *S. agalactiae* (A13 en naranja): ausencia de señal. Control positivo *Listeria* (A14 en verde): ausencia de señal.



Gráfica 2 (Canal TxR: *S. agalactiae*): Resultado obtenido al amplificar un control negativo, un control positivo *E. coli,* un control positivo *S.agalactiae* y un control positivo *Listeria*. Control negativo (A11 en azul): ausencia de señal. Control positivo *E. coli* (A12 en gris): ausencia de señal. Control positivo *S. agalactiae* (A13 en naranja): se observa una señal con Ct=29,96. Control positivo *Listeria* (A14 en verde): ausencia de señal.



Gráfica 3 (Canal Alx647: *Listeria*): Resultado obtenido al amplificar un control negativo, un control positivo *E. coli,* un control positivo *S.agalactiae* y un control positivo *Listeria*. Control negativo (A11 en azul): ausencia de señal. Control positivo *E. coli* (A12 en gris): ausencia de señal. Control positivo *S. agalactiae* (A13 en naranja): ausencia de señal. Control positivo *Listeria* (A14 en verde): se observa una señal con Ct=30,91.



Gráfica 4 (Canal Alx532: control interno): Resultado obtenido al amplificar un control negativo, un control positivo *E. coli,* un control positivo *S.agalactiae* y un control positivo *Listeria*. Control negativo (A11 en azul): se observa una señal con Ct=28,17. Control positivo *E. coli* (A12 en gris): se observa una señal con Ct=27,81. Control positivo *S. agalactiae* (A13 en naranja): se observa una señal con Ct=28,03. Control positivo *Listeria* (A14 en verde): se observa una señal con Ct=28,14.

10 Control de calidad

Se recomienda que se lleven a cabo controles positivos y negativos cada vez que se realice un análisis.
Cada lote del kit *RealCycler* ECSALI-G ha sido testado según las especificaciones de la PCR a tiempo real utilizando el equipo *SmartCycler*® (*Cepheid*®).

11 Observaciones

Tabla de compatibilidad de fluoróforos.

Fluoróforo	**Fluoróforo alternativo**
FAM	
TET	CAL Fluor Gold 540
HEX	JOE, VIC, CAL Fluor Orange 560, Alexa 532
Texas Red	ROX, LC Red 610, CAL Fluor Red 610
Alx647	Cy5, Quasar 670, LC Red 670, ATTO 647N

Fecha de publicación: Julio 2012.